

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06319396 A**

(43) Date of publication of application: **22.11.94**

(51) Int. Cl

A01H 5/00

C12N 15/13

C12P 21/08

(21) Application number: **05131208**

(22) Date of filing: **07.05.93**

(71) Applicant: **JAPAN TOBACCO INC KURARAY CO LTD**

(72) Inventor:
**SAITO YASUTO
KOGIKU TOSHIHIKO
KAMISHIRO TAKASHI
MURAFUJI HITOAKI
TAKAMI MASAAKI
FUMINO MASAYASU**

**(54) PLANT FOR PRODUCTION ANTIVIRAL
ANTIBODY AND METHOD FOR CREATING THE
SAME PLANT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a plant for producing antiviral antibody and a method for creating the plant.

CONSTITUTION: The plant produces antiviral monoclonal antibody derived from animals including human. The method for creating this plant contains a step for

establishing a hybridoma producing monoclonal antibody to desired virus, a step for preparing cDNA from the hybridoma, a step for selecting cDNA coding H chain and L chain of the monoclonal antibody from the cDNA, a step for integrating the cDNA into a plant expression vector, a step for transforming a desired plant with the plant expression vector and a step for selecting the plant producing desired antibody from the plant after transforming step.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-319396

(43)公開日 平成6年(1994)11月22日

| | | | | |
|--------------------------|-------|--------------------|---------------|--------|
| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 府内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| A 01 H 5/00 | ZNA A | 8502-2B | | |
| C 12 N 15/13 | | | | |
| C 12 P 21/08 | | 8214-4B 9050-4B | C 12 N 15/ 00 | A |

審査請求 未請求 請求項の数 8 FD (全 26 頁)

| | | | |
|----------|----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平5-131208 | (71)出願人 | 000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都品川区東品川4丁目12番62号 |
| (22)出願日 | 平成5年(1993)5月7日 | (71)出願人 | 000001085 株式会社クラレ 岡山県倉敷市酒津1621番地 |
| | | (72)発明者 | 斎藤 靖人 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ 産業株式会社遺伝育種研究所内 |
| | | (72)発明者 | 小鞠 敏彦 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ 産業株式会社遺伝育種研究所内 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 谷川 英次郎 |
| | | | 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法

(57)【要約】

【目的】 抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法を提供すること。

【構成】 動物(ヒトを含む)由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を産生する植物を提供する。また、本発明は、所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマからcDNAを調製する工程と、該cDNAから、前記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択する工程と、該cDNAを植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を産生する植物を選択する工程を含む、上記本発明の植物の作出方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を产生する植物。

【請求項2】 前記ウイルスはタバコモザイクウイルスである請求項1記載の植物。

【請求項3】 タバコである請求項1又は2記載の植物。

【請求項4】 所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマからcDNAを調製する工程と、該cDNAから、前記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択する工程と、該cDNAを植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を产生する植物を選択する工程を含む、請求項1記載の植物の作出方法。

【請求項5】 前記ウイルスはタバコモザイクウイルスである請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記植物はタバコである請求項4又は5記載の方法。

【請求項7】 前記植物発現ベクターはTiプラスミド系のベクターであり、前記形質転換工程は、Tiプラスミド系組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンスに組み込み、次いで該アグロバクテリウム・ツメファシエンスを植物に感染させることにより行われる請求項4ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記H鎖及びL鎖をコードするcDNAは、それぞれのリーダー配列を有する請求項4ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗ウイルス抗体を产生する植物及びその作出方法に関する。本発明は抗体の工業的生産及び耐ウイルス植物の作出に有用である。

【0002】

【従来の技術】現在、抗ウイルスモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法により生産されている。すなわち、動物をウイルスで免疫し、この動物からの抗体産生細胞と骨髄腫細胞との間に融合細胞ハイブリッド（ハイブリドーマ）を形成させ、これをクローン化する。次いで上記ウイルスに対し特異性を示す抗体を產生するクローンを選択し、培養を行って上記ウイルスに対するモノクローナル抗体を得る。

【0003】しかしながら、このハイブリドーマ法を用いた抗ウイルス抗体の製造方法は時間とコストがかかる。

【0004】一方、Andrew Hiatt et al., Nature, 342 (1988) 76-78 "Production of antibodies in transgenic plants"には、低分子のリン酸エステル（P3）に結合し、カルボン酸エステルの加水分解を触媒する6D4

という抗体に対する遺伝子をタバコに導入したことが記載されている。6D4抗体のH鎖（heavy chain）及びL鎖（light chain）遺伝子それについてリーダー配列を含むもの、欠くものの、合計4種類の遺伝子をアグロバクテリウムを用いてタバコに導入した。H鎖、L鎖を生産している形質転換体で交配を行うことにより両鎖のタンパクを結合させた。結合には、リーダー配列が必要であった。この結果、葉の全可溶性タンパクの1.3%にあたる抗体が形質転換体内で生成された。形質転換体内で生成される抗体と抗原であるP3との結合はハイブリドーマ由来の抗体と同様、特異的であった。

【0005】しかしながら、この方法では、交配することによって抗体を生成している形質転換体を得るために、時間と労力がかかる。また、抗原はウイルスではない。ウイルスのような高分子成分を抗原にした場合、活性部位の立体構造が植物細胞中で動物と同様に組み立てられるか問題がある。

【0006】また、Klaus Duringら、Plant Molecular Biology, 15(1990)281-293 "Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic Nicotiana tabacum"には、B1-8抗体に対する遺伝子を導入したタバコが記載されている。B1-8抗体のH鎖及びL鎖遺伝子に大麦アリューロン層α-アミラーゼのシグナル配列を接続し、両鎖遺伝子を連結させアグロバクテリウムを用いてタバコに導入した。形質転換体で両鎖が結合し、活性のあるB1-8抗体が生成された。電子顕微鏡観察を行ったところ、小胞体のみならず葉緑体においても抗体が存在することが明らかとなった。

【0007】しかしながら、この論文には、生成された抗体の生成量については詳しく報告されておらず、抗体の生成量は上記Hiattらの交配法に比較して低いと考えられる。また、植物体で生成された抗体は抗ウイルス抗体ではない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、ハイブリドーマ法による抗ウイルス抗体の製造は時間とコストがかかる。また、従来、植物に抗ウイルス抗体を產生させた例はない。従って、本発明の目的は、抗ウイルス抗体を产生する植物及びその作出方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗ウイルス抗体を产生するハイブリドーマのcDNAを含むベクターで植物を形質転換することにより、抗ウイルス抗体を产生する植物を作出することに成功し、本願発明を完成了。

【0010】すなわち、本発明は、動物（ヒトを含む）由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を产生する植物を提供する。また、本発明は、所望のウイルスに対するモ

ノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマからc DNAを調製する工程と、該c DNAから、前記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするc DNAを選択する工程と、該c DNAを植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を產生する植物を選択する工程を含む、上記本發明の植物の作出方法を提供する。

【0011】以下、本發明を詳細に説明する。

【0012】本發明の植物は、動物由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を產生するものである。植物は、下記実施例においてはタバコを用いたが、これに限定されるものではない。また、モノクローナル抗体は、下記実施例ではマウス由来のものであるが、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等の他の哺乳動物由来のものやニワトリ等の鳥類由来のものであってもよい。また、ウイルスは、下記実施例ではタバコモザイクウイルス(TMV)を用いたが、これに限定されるものではなく、抗体が医薬、動物用薬、診断薬等として有用ないずれのウイルス又は植物がそれに対する抵抗性を持つことが望まれるいずれのウイルスであってもよい。

【0013】本發明の植物は、次の方法により作出することができる。

【0014】まず、所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを樹立する。これは常法であるハイブリドーマ法により行うことができ、その操作の1例の詳細は下記実施例に記載されている。なお、下記実施例では、後の工程で得られたc DNAが該モノクローナル抗体をコードするものであることを確認するために、該モノクローナル抗体を精製し、そのアミノ酸配列を部分的に同定した。

【0015】次いで、該ハイブリドーマからc DNAを調製する。c DNAの調製は、ハイブリドーマから全m RNAを常法により回収し、これを錆型として逆転写酵素を作用させて行うことができる。c DNAは、常法により、大腸菌等を宿主として用いたc DNAライプラリーに調製することができる。さらに、下記実施例では、全m RNAをショ糖密度勾配遠心にかけ、H鎖遺伝子のm RNA分画(以下、H-m RNAということがある)と、L鎖遺伝子のm RNA分画(以下、L-m RNAということがある)とを得、それぞれ公知の定常領域の配列を有するオリゴプライマーを用いて逆転写を行い、c DNAを作製した。これらのc DNAは、次の工程で上記c DNAライプラリーからH鎖及びL鎖をコードするc DNAを選択するためのプローブとして用いた。

【0016】次いで、上記c DNAライプラリーから、上記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするc DNAを選択する。これは、上記H-m RNA及びL-m RNAからそれぞれ調製した一本鎖c DNAをプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションにより

行うことができる。この操作の詳細は下記実施例に記載されている。選択したコロニーよりラピッドプラスミド単離法(rapid plasmid isolation法)等によりプラスミドを得、それからPst Iのような適当な制限酵素により挿入断片を切り出し、ゲル電気泳動等によりその長さを検定し、目的に合う長さの断片を持つコロニーをさらに選別することができる。この挿入断片について、文献既知の定常領域をプローブとするサザン・ハイブリダイゼーションを行い、免疫グロブリンc DNAを持つクローンを選定することができる。さらに、念を入れるならば、上記挿入断片を各種制限酵素で消化し、その切断パターンを文献記載のL鎖及びH鎖の定常領域のそれと比較して免疫グロブリンc DNAクローンの同定を行うことができる。下記実施例ではさらに、このようにして選択されたH鎖コードc DNA及びL鎖コードc DNAの塩基配列をマキサム-ギルバート法(Maxam & Gilbert法)により決定した。

【0017】次いで、H鎖及びL鎖をそれぞれコードするc DNAを植物ベクターに組み込む。遺伝子の植物細胞への導入は完成されたベクター系を用いることが好ましく、現在のところTiプラスミドを用いる系が最良である。なお、Tiプラスミド系ベクターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)に含まれるTiプラスミド中の左右ボーダー領域を有するものが、強力な植物形質転換能力を有することを利用したベクターである。Tiプラスミド系に組み込むために、c DNA断片の5'上流非翻訳部分において、ATGの上流(例えば10~30bps上流)にTiベクターに組み込むための制限酵素リンカーを付加し、一方、終止コドンの3'下流非翻訳部分において終止コドンとポリA部分との間にも同じ制限酵素リンカーを付加することが好ましい。このようにすれば、リンカーとして導入した制限酵素部位を切断する制限酵素で、調製したc DNAが1つの断片として切り出され、それをそのままTiプラスミド系に組み込むことができるるので好都合である。このようなc DNA断片を、例えば大腸菌ベクター中にクローニングし、大量調製した後、植物ベクターに組み込むことが好ましい。なお、上記制限酵素リンカーに切断部位を有する制限酵素は、H鎖及びL鎖c DNA中に切断部位を持たず、しかもc DNA調製の際に用いるベクター中にクローニング部位以外に切断部位を持たないものを選択する必要がある。なお、用いるクローニングベクターのマルチクローニング部位中の所望の制限酵素部位がない場合には、常法によりこれを導入することができる。下記の実施例では、クローニング用ベクターとして大腸菌ベクターpUC18及びpUC9(Pharmacia PLより市販)を用い、制限酵素リンカーとしてはBgl IIリンカーを用いた(なお、pUC18及びpUC19にはマルチクローニング部位中にBgl II部位がないので、これを導入した)。

【0018】次いで、クローニングしたH鎖及びL鎖cDNA断片を、Tiプラスミド系の上記のような植物ベクターに組み込む。この操作は、上記制限酵素リソマリーゼでcDNA断片を切り出し、同じ制限酵素で植物ベクターを切断してcDNA断片を植物ベクター中に組み込むことによって行うことができる。H鎖cDNAとL鎖cDNAとは別々のベクターに入っていてもよいが、同一のベクター中に入っていると操作が簡便になるので、下記実施例では後者を採用した。これは、例えば、H鎖cDNAを含む組換えベクターと、L鎖cDNAを含む組換えベクターを上記方法でまず作製し、次いで、これらを組み替えることにより行うことができる。

【0019】植物ベクターとしてTiプラスミド系を用いた場合、これで植物を形質転換するためには、上記組換えベクターを凍結法等により、先ず、アグロバクテリウム・ツメファシエンスに導入し、これを植物に感染させることにより行う。植物への感染は、液体培地で中植物断片（例えば葉片）と上記組換えTiプラスミドベクター含有アグロバクテリウム・ツメファシエンスとを共存培養することにより行うことができる。次いで、植物断片を茎葉分化培地で培養し、次いで発根培地で培養することにより、形質転換された植物体を得ることができる。

【0020】次いで、得られた植物から所望の抗体を產生する植物を選択する。これは、ELISAのような免疫分析により、抗原ウイルスと特異的に反応する抗体が產生されているか否かを調べることにより行うことができる。選択の効率を高めるため、これに先立ち、例えば、植物細胞からmRNAを抽出し、常法であるノーザン分析により抗体のmRNAを產生している植物を選択し、さらに、ウェスタン分析でH鎖及びL鎖の発現を確認することが好ましい。さらには、Protein Aのような抗体の定常領域に特異的に結合する物質を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより得られたものをウェスタン分析することにより、両鎖の会合を確認することができる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】1. 抗TMVモノクローナル抗体の作製

1-1

マウスをTMV又はTMVのコートタンパク(CP)で免疫した。免疫は $50\mu\text{g}/\text{回}$ の投与量で2~3回行った。最終免疫3日後にマウスから脾細胞を取り出した。マウスミエローマ細胞(P3-X63-Ag-U1(P3-U1)、P3-NS1/1-Ag4-1(NS-1)及びX63-Ag8-6.5.3(Ag 8-6.5.3))2~

10×10^7 個と免疫したマウスから取り出した脾細胞(1~ 3×10^8 個)をRPMI1640培地で洗浄後混合した。 50% PEG4000溶液(RPMI1640培地に溶かす)を1分間かけて滴下し、1分間搅拌後RPMI1640培地 10ml で徐々に希釈した。遠心後HAT培地(RPMI1640培地、FCS 10%、ヒポキサンチン 10^{-4}M 、チミジン $1.6\times10^{-5}\text{M}$ 、アミノブテリン $4\times10^{-7}\text{M}$)に懸濁し、96穴プレートに $1\sim5\times10^5$ 個(脾細胞)ずつ分注して培養した。2~4日ごとに培地を交換し、適当な時期にHT培地(RPMI1640培地ヒポキサンチン 10^{-4}M 、チミジン $1.6\times10^{-5}\text{M}$)に切り換えた。増殖の認められたウエルはRIAあるいはELISAでTMV(又はCP)を抗原としてスクリーニングを行った。すなわち、TMVあるいはCPを含むPBS($10\mu\text{g/ml}$, 0.15M NaCl , 10mM リン酸緩衝液、pH 7.5) $50\mu\text{l}$ をマイクロタイタープレートに入れ抗原を吸着させ、ブロック処理後、適当に希釈した培養上清と反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG(HRP-抗マウスIgG)溶液と反応させ、O-フェニレンジアミンと過酸化水素を基質として発色させ、492nmの吸光度を測定した。得られた抗体のサブクラスは、ELISAとオーカタロニーにより決定した。

【0023】1-2

上記操作により、100~300個のハイブリドーマが1回の融合で得られ、このうち抗TMV又は抗TMVC-Pに特異的なモノクローナル抗体を产生するものは10~30%であった。これらのうち、6ヶ月以上の継代培養でも抗体生産能は低下しない、安定なハイブリドーマであるハイブリドーマP-7を以下の操作に用いた。ハイブリドーマP-7が产生するモノクローナル抗体P-7のサブクラスはIgG₁であった。

【0024】1-3

P-7モノクローナル抗体の精製及びアミノ酸シーケンス

①図1に示す方法によりP-7モノクローナル抗体を精製した。この方法により、FCS由来のウシIgGがほぼ完全に除去されたP-7モノクローナル抗体を調製することができた。

【0025】② P-7MabのH鎖、L鎖に対して作製したcDNA(H-cDNA, L-cDNA)を蛋白質レベルで同定するため、精製したP-7Mabを用いて、H鎖とL鎖の分離並びにN末のアミノ酸シーケンスの決定を試みた。H鎖とL鎖の分離は図2に示す方法により行った。L鎖に関しては、SDS-PAGE後ゲルから抽出し、HPLCで精製することによりアミノ酸シーケンサーにかけることができた。この結果、N末から14番目までがcDNAからの推定アミノ酸と一致した(表1)。

【0026】

【表1】

| アミノ酸No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-------|
| アミノ酸シーケンサー | Asp | ILe | Val | Met | Thr | Glu 又は Gln | Ala |
| c DNAからの推定アミノ酸 | Asp | ILe | Val | Met | Thr | Gln | Ala |
| アミノ酸No. | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| アミノ酸シーケンサー | Ala | Pro | Ser | ILe | Pro | Val | (Thr) |
| c DNAからの推定アミノ酸 | Ala | Pro | Ser | ILe | Pro | Val | Thr |

【0027】なお cDNA の C、J 領域が既報の IgG₁ と一致したことを考慮すると、作製した cDNA は、P-7Mab に対応するものと考えられる。

【0028】一方、H鎖は、N末がブロック（ピログルタミン酸）されていたため、L鎖と同じ方法ではアミノ酸列を決定出来なかったので、次に述べる方法で解析した。まず、図2の方法にしたがってH鎖を分離した。

【0029】分離したH鎖は、BrCNで分解し、トリプシン及びV-8で消化を行った後、FAB マススペクトロメトリーにより生成フラグメントの同定を行った。FAB

マススペクトロメトリーの解析能力を考えると分子量5万で糖鎖の結合した物質を完全に同定することは不可能であるが、一部のフラグメントを表2に示す。この結果から、H鎖に関しても cDNA と蛋白 (P-7Mab) とは対応する可能性がある。より正確には、Fc部分を除去し、分子量を約2～2.5万にし、図2の方法で確認するか、他の方法で解析しなければならない。

【0030】

30 【表2】

| フラグメント ⁽¹⁾ | 分子量 | 使用した消化酵素 ⁽²⁾ | フラグメント ⁽¹⁾ | 分子量 | 使用した消化酵素 ⁽²⁾ |
|-----------------------|------|-------------------------|-----------------------|------|-------------------------|
| 1- 10 ⁽³⁾ | 1070 | V-8 | 322-333 | 1243 | TP |
| 68- 74 | 719 | TP | 358-367 | 1122 | V-8 |
| 82- 89 ⁽³⁾ | 801 | V-8 | 368-374 | 868 | V-8 |
| 183-189 | 770 | V-8 | 375-379 | 576 | V-8 |
| 219-222 | 484 | TP | 380-388 | 1115 | V-8 |
| 248-257 | 1100 | TP | 398-416 | 2377 | V-8 |
| 272-282 | 1370 | V-8 | 430-437 | 944 | V-8 |
| 305-308 | 443 | V-8 | | | |

(1) 数値はN末端からのアミノ酸番号を示す。 (2) TP : トリプシン、V-8 : Staphylococcus aureus の產生する酵素。 (3) 1-10、82-89はN末端がグルタミンになっており、これはエドマン分解でも分解されないことが確認されている。

【0031】2 抗 TMVマウス IgG・cDNA のクローニング

2-1 抗 TMVマウス IgG の mRNA の抽出

抗 TMVマウス IgG 產生ハイブリドーマ P-7の2g 濡潤ベレットよりGTC 法により、全 RNAを抽出した後、oligo-dTセルロースカラムを通すことにより、poly ARNA (=mRNA) を 300μg 得た。これを全 mRNA とした。さらに、この一部 109μg を 5~20% ショ糖密度勾配遠心法により分画した後、それぞれの画分をインビトロトランスレーション(in-vitro translation)により検定した。活性を持つ全mRNAの大半が、L鎖およびH鎖のmRNAに相当する分画にありハイブリドーマ P-7の產生するmRNAのうちのかなりの部分が IgG mRNA であると思われる。17S に相当するFr9~11より H鎖mRNA (10μg) を得、13S に相当するFr13~15より L鎖mRNA (7μg) を得た。

【0032】2-2 IgG・cDNA ライブライマーの作製

鉄型mRNAにDNA合成のプライマーをハイブリダイズさせ、逆転写酵素によりmRNAと相補的な-L鎖cDNAを合成し、次いで-L鎖cDNAと相補的な+鎖cDNAをDNAポリメラーゼを用いて合成し、鉄型mRNAに相補的な二本鎖DNAを合成した。この操作は以下に示すように、Gubler法(Gene、25巻、ページ263-269、1983年)により次の3つの場合に分けて行った。

【0033】①全 mRNA 鉄型: oligo-dTプライマー
全mRNA 5 μg を鉄型、oligo-dT (PdT12-18) をプライマーとして用い、RNase阻害剤 (RNasin) 存在下、AMV 逆転写酵素 (RTase) により mRNA と相補的な一本鎖 cDNA (sscDNA) を mRNA とのハイブリッドで得た。次いで RNaseH、DNA ポリメラーゼ I (Konberg)、E.coli DNAリガーゼにより 2本鎖 DNA (dscDNA) とした。得られた2本鎖DNAは種々の長さの混合物であるので、セファロースCL-6Bカラム(ファルマシア社より市販)を通し600bp s以下のかなうのcDNAを除去した。このdscDNAを pBR322 に組み込むために、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase) (TdTase)、dCTPを用い dscDNA の両 3' 末に dC (10-20) を付加したものと、市販されている pBR322 の PstI 部位 3' 末に dG (25) 付加されたもの (Pharmacia PLより市販) を dC-dG アニーリングさせ環状として、E. coli K12 RRI (recA+) を形質転換した。テトラサイクリン耐性のコロニーとしてcDNAライブライマーを得た (5×100,000コロニー/1 μg cDNA)。

【0034】②L鎖 mRNA 鉄型: 合成オリゴマー 15bs プライマー

ショ糖密度勾配遠心により分画したL鎖 mRNA 5 μg を鉄型、合成オリゴマー [5'-CCTCCAGATGTTAAC: L鎖定常領域の 5' 側のHpaI部位を含む15bs] をプライマーとして用い、①とまったく同様に行なった。形質転換の効率は 5×100,000コロニー/1 μg cDNA であった。

【0035】③H鎖 mRNA 鉄型: 合成オリゴマー 15bs プライマー

ショ糖密度勾配遠心により分画したH鎖 mRNA 5 μg を鉄型、合成オリゴマー [5'-AGGGTCACCATGGAG: H鎖定常

11

領域の 5' 側の Nco I 部位を含む15bs] をプライマーとして用い、①とまったく同様に行なった。形質転換の効率は $3 \times 100,000$ コロニー／ $1 \mu\text{g}$ cDNA であった。

【0036】2-3 IgG・cDNA クローンの検索と同定

2-3-1 L鎖 cDNA クローンの検索と同定

1) コロニーハイブリダイゼーションを行なうに当たりまずプローブを作製した。L鎖 mRNA $5 \mu\text{g}$ よりオリゴ dT プライマーを用い、cDNA作成とまったく同様の方法により sscDNA と mRNA のハイブリッドを得、これを 0.2M NaOH で加水分解して sscDNA を得た。この時塩基に α -32PdCTP, α -32PdATP の 32P ラベルされた塩基を用い、sscDNA を RI ラベルした。

【0037】2) 上記のプローブを用いて、cDNA ライブライリー①及び②それぞれ約 2000 個のコロニーについてコロニーハイブリダイゼーションを行なった。選択したコロニーの個数は全 mRNA からオリゴ dT プライマーを用いて作製した cDNA ライブライリーから 204 個、L鎖 mRNA から合成オリゴマーを用いて作製した cDNA ライブライリーから 33 個であった。

【0038】3) これら選択したコロニーよりラピッドプラスミド単離(rapid plasmid isolation) 法でプラスミドを調製し、PstI 消化後、1.2% アガロースゲル電気泳動により切り出される断片の長さを検定し、300～1200bps の断片をもつクローンを選択した。cDNA ライブライリー①から 30 個、cDNA ライブライリー②から 16 個のクローンを選択した。

【0039】4) 次に PstI で切り出される断片のサザンハイブリダイゼーションを行なった。プローブとして Philip Leder 博士より提供されたマウス emb RI Ck+Jk (Charon 4A ベクター中でクローニング) をニックトランスレーションにより RI ラベルしたもの用いた。先程選択した①の 30 個より、長い断片を持つクローン 18 個を選びサザンハイブリダイゼーションを行ない、強くハイブリダイズするクローン 1 個を得た。同様に②の 16 個より 14 個を選び、サザンハイブリダイゼーションをおこない、ハイブリダイズするクローン 3 個を得た。

【0040】5) 得られた各クローンについて大スケールでプラスミドを調製し、各種制限酵素で消化し、その切断パターン(図 3)を文献記載の L鎖定常領域のそれと比較することによって①より得られたクローン EL-39 が IgG L鎖 cDNA の全領域を持つものと同定された。②より得られたクローンについて全領域を持たないことより、以後の検索は行なわなかった。

【0041】2-3-2 H鎖 cDNA クローンの検索と同定

1) L鎖の場合と同様にコロニーハイブリダイゼーションにより可能性のあるクローンを選択した。プローブの作製は、H鎖 mRNA $5 \mu\text{g}$ 、オリゴ dT プライマーを用いて、cDNA 作製および L鎖におけるプローブの作成と同

12

様の方法により、RI ラベルされた sscDNA を調製した。

【0042】2) このプローブを用いて、①および③の cDNA ライブライリーそれぞれ約 2000 個のコロニーについてコロニーハイブリダイゼーションを行ない、コロニーを選択した。選択したコロニーの個数は全 mRNA からオリゴ dT プライマーを用いて作製した cDNA ライブライリーから 69 個、H鎖 mRNA から合成オリゴマーを用いて作製した cDNA ライブライリーから 28 個であつた。

【0043】3) これら選別したコロニーよりラピッドプラスミド単離法によりプラスミドを調製した後、PstI で消化し、1.2% アガロース電気泳動で切り出される断片の長さを検定し、300～1200bps の断片を持つクローンを選択した。cDNA ライブライリー①より 28 個、③より 17 個のクローンを選択した。

【0044】4) 次に PstI で切り出される断片のサザンハイブリダイゼーションを行なうに当たり、プローブとして使用するために既にクローン化された H鎖の遺伝子が入手出来なかつたので、前述の cDNA 作成の際使用した、合成オリゴマー 5'-AGGGTCACCATGGAC (H鎖定常領域の 5' 端付近の配列) の 5' 端に RI ラベルしたものをプローブとして用いた。①より選択した 28 個のうち～900bps 以上の断片を持つクローンについて、③より選択したものについては 16 クローンについてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、いずれもハイブリダイズするものはなかつた。

【0045】5) しかし①より得られた～900bps 以上の断片を持つものの 4 クローンについては、用いたプローブの位置 (H鎖定常領域の 5' 端付近、ポリ A 部位から上流～1000bps の位置) まで cDNA の合成が行なわれていないう可能性もあり、そのうちの 2 クローンについては大スケールでプラスミドを調製し、各種制限酵素による消化を行ない、文献に記載されている定常領域の制限酵素地図と比較したところ、その内の一つのクローン EH-16 の制限酵素地図が文献のそれと一致した(図 4)。

【0046】クローン EH-16 は図 4 より明らかのように H鎖の 3' 末から定常領域の～80% をコードしているにすぎず、5' 側の可変領域をコードする cDNA を持つクローンは得られなかつたので、さらに H鎖 cDNA クローンの検索を行なつた。

【0047】2-3-3 H鎖 cDNA クローンの再検索と同定

1) ①全 mRNA : オリゴ dT プライマーより作成した cDNA ライブライリーから～10000 個のコロニーについて再度コロニーハイブリダイゼーションを行なつた。可変領域をコードする cDNA を持つクローンを得る目的で、先程用いた合成オリゴマー 5'-AGGGTCACCATGGAG (定常領域の 5' 端付近の配列) をプローブとして用いて行なつた結果、5 個の強くハイブリダイズするコロニーを選択し

た。

【0048】2) これらコロニーよりラピッドプラスミド単離法によってプラスミドを得、BamHI, PstI およびその他の制限酵素で消化し、アガロース電気泳動により切り出された断片の長さを検定するとともに、BamHI, PstI 断片については先程と同じプローブを用いてサザン*

*ハイブリダイゼーションを行なった。

【0049】下記表3に制限酵素で切り出された断片の長さを示すとともに、プローブとハイブリダイズした断片に下線を付けた。

【0050】

【表3】

| 制限酵素 | クローン | | | | |
|--------|---------|------|------|------|------|
| | HII-1 | -2 | -3 | -4 | -5 |
| BamHI | 3900bps | 3400 | 3900 | 4200 | 3900 |
| | 1680 | 1400 | 1650 | 1300 | 1650 |
| PstI | 4360 | 4360 | 4360 | 4360 | 4360 |
| | 450 | | 450 | 800 | 450 |
| | 380 | | 380 | 300 | 380 |
| | | | | | |
| AccI | 3500 | | 3500 | 3600 | 3500 |
| | 1800 | | 1800 | 2000 | 1800 |
| | 1700 | | 1700 | 1800 | 1700 |
| | 890 | | 890 | 1700 | 890 |
| HincII | | | 500 | | |
| | 4360 | | 4360 | 3400 | 4360 |
| | 1250 | | 1250 | 1250 | 1250 |
| SmaI | | | 1000 | | |
| | 5200 | | 5200 | 5200 | 5200 |

【0051】表3よりクローンHII-1, -3, -5は同じであり、クローニングされたcDNAは定常領域の中ほどより可変領域を持つと思われる。一方クローンHII-4ではプラスミドpBR322に挿入されたcDNAの向きが前者とは逆になっており、可変領域はほとんど含まないと思われる(図5)。pHII3を得、各種制限酵素で消化を行ない、その切断パターン(図3)を文献記載のものと比較した。その結果pHII3は可変領域のほぼ全域と定常領域の5'側の一部を含むことが明かとなり、その定常領域の制限酵素地図は文献のそれと一致した(図3)。

【0052】以上の結果、次の3クローンが同定され、ここに IgG cDNA の全領域がクローン化された。

・L鎖 cDNA クローン：：EL39 ほぼ全領域をクローン化する

・H鎖 cDNA クローン：：EH16 定常領域の3'側80%をクローン化する

HII-3 定常領域の5'側50%と可変領域の全域をクローン化する

pBR322にクローニングされたcDNAプラスミドをそれぞれpEL39, pEH16, pHII3と略す。

【0053】2-4 抗TMVマウスIgG・cDNAの制限酵素地図および塩基配列

1) DNA 塩基配列決定のための制限酵素地図の作成。

IgGの定常領域はBalb/Cマウスの同一クラスIgG(P-

7の場合、クラスは γ 1、L鎖は κ)では同じであるので、定常領域だけをコードするpEH16、およびpEL39、pHII3の定常領域については制限酵素による消化と文献記載の配列によって制限酵素地図を作成した。可変領域については、プラスミドpEL39, pHII3をそのまま、あるいはプラスミドより切り出したcDNAを、あるいはcDNAの一部の断片を各種の制限酵素で切断し、アガロース及びポリアクリルアミド電気泳動によってその切断断片の長さを決定し、cDNA上に並べて位置関係を推定して地図を作成した(図3)。

【0054】2) 塩基配列の決定

制限酵素地図を参考に、適当な部位の5'端のリン酸基をRIラベルしたDNA断片を調製し、マキサムーギルバート法により塩基配列を決定した。図3に塩基配列決定の方向と長さを示し、図6及び図7にL鎖、図8～図10にH鎖cDNAの塩基配列を示した。

【0055】II-3 植物ベクターへ組み込むためのIgG・cDNAの調製

遺伝子の植物細胞への導入は完成されたベクター系が必要であり、植物で機能するものとしては現在のところTiプラスミドを用いる系が最良である。Tiプラスミド系に組み込むためのcDNAの満たすべき条件として、以下の点を想定した。

1) 開始コドンATGの5'上流非翻訳部分に於いてATGよ

り上流10~30bps の間にTi系に組み込むための制限酵素リソリンカーアを付加する。一方終止コドンの3'下流非翻訳部分に於いて終止コドンとポリA部位の間にも同じ制限酵素リソリンカーアを付加する。すなわちリソリンカーアとして導入した制限酵素で、調製したcDNAが一つの断片として切り出され、それをそのままTiプラスミド系に組み込むことが出来るよう調製する。

2) L鎖およびH鎖のそれぞれについてリーダー配列を持つものと、リーダー配列を含まない成熟配列だけのcDNAの両者を1)の条件を満たすように調製する。

[IgGはリーダー配列を持って発現されるが、分泌される時点でリーダー配列は切り取られ成熟 IgGとして分泌される。]

前出の制限酵素リソリンカーアはL鎖およびH鎖 cDNA中に切断部位を持たず、しかも cDNA 調製の際に用いるベクター中にクローニング部位以外に切断部位を持たないものとしてBgl IIを選んだ。ベクターは13個の制限酵素部位よりなる MCS (マルチクローニング部位) を持つ pUC18を選んだ。ベクターの構築は塩基配列より予想される制限酵素地図を参考にして行なった。以上の各条件を満たして調製された IgG cDNA を組み込んで構築されるべき cDNA ベクターを次のように略記する。

pUCLM - L鎖、成熟L鎖をコードする cDNA を pUC18に組み込んだもの。

pUCLL - L鎖、リーダー配列を含むL鎖をコードする cDNA を pUC18に組み込んだもの。

pUCHM - H鎖、成熟H鎖をコードする cDNA を pUC18に組み込んだもの。

pUCHL - H鎖、リーダー配列を含むH鎖をコードする cDNA を pUC18に組み込んだもの。

【0056】3-1 ベクター pUC18の改変

調製された cDNA を組み込むためのベクターとして pUC18 (Pharmacia PLより市販) を選んだが、pUC18 の MCS (マルチクローニング部位) にはクローニング部位となるべき、さきほどリソリンカーアとして選んだ Bgl II の切断*

| | | |
|----------|-------------|--------|
| pUCLPR70 | EcoRI-PstI | 90bps |
| pEL39 → | PstI-Bgl II | 600bps |
| ↓ | | |

pUC18BgSma ベクターのマルチクローニング部位中のEco RI-Bgl II
[pUCLM]

【0060】得られたクローナー pUCLMについて、接続部位の制限酵素部位 (EcoRI, Pst I, Bgl II) および構築の際、新しく出来る Nco I 部位 (5'端のATGの所)、再生成される Ava II 部位はそれぞれの制限酵素の消化により確認した。また、5'および3'端の DNA シーケンシングにより成熟 cDNA の 5' および 3' 端に欠失はなく、最初の条件を満足する位置に Bgl II 部位を持つことが確認された。

【0061】3-2-2 pUCLL (L鎖リーダーcDNA)

1) リーダー配列の開始コドン ATG の上流 30bps 以内に

*部位がないので、まず pUC18の MCSに Bgl II 部位を導入した。

①pUC18 MSC の SacI を Bgl II に置き換えたもの [pUC18BgSac]

②pUC18 MSC の SmaI を Bgl II に置き換えたもの [pUC18BgSma]

以上の二種のベクターを調製した。さらに pUC18と MCS における制限酵素の配列が逆になっている pUC9 (Pharmacia PLより市販) についても同様に行なった。

10 ③pUC9 MCSの Bam HI を Bgl II に置き換えたもの [pUC9BgBam]

図11に各ベクターのMCS 部分の配列と制限酵素部位を示す。これらの配列は、後述の構築した cDNA ベクターのシーケンシングにより決定した。

【0057】3-2 cDNAベクターの構築

3-2-1 pUCLM (L鎖成熟 cDNA)

1) L鎖 cDNA 5'側のリーダー配列を取り去って mature sequence の 5' 端に開始コドン ATG を付加するためには、CATGの次に成熟配列 5' 端 15bs を持つ合成オリゴ

20 マー19bs CATG-GATATTGTGATGACT (下線の配列が成熟配列の 5' 端) を用いて、プライマーリペア (primer repair) 法で 5' 端 ATG を調製し、PstI 消化により 70bps の断片として、成熟 cDNA の 5' 先端部分を得た。この 70bps 断片を、まず pUC18BgSac の SmaI-PstI 部位にクローニングした (pUCLPR70)。

【0058】2) L鎖 cDNA 3'側、終止コドン TAG の下流 6bps に AvaiI 部位が有り、ここで切断して、DNA ポリメラーゼ I ラージフラグメント (Klenow type) (以後、klenowと略す) で平滑末端とし、Bgl II リソリンカーアを付加した。その後、Bgl II-Pst I で切断し 600bps の断片として L鎖 cDNA の 3' 側を得た。

【0059】3) pUCLPR70 より Eco RI-Pst I 消化で 90bps 断片を得、成熟 cDNA の 5' 側とした。これと、

2) 得た 600bps 3' 側断片を同時に pUC18BgSma の EcoRI-BglII 部位にクローニングした。

90bps 断片 cDNA 5' 側

600bps 断片 cDNA 3' 側

適当な制限酵素部位がないことより、ATG のすぐ後にある Ban I 部位を用い、開始コドン ATG を Nco I リソリンカーアと結合することにより再生する方法で、リーダー配列の 5' 端を調製した (図12)。この時、開始コドン ATG の次の塩基が、A → G と代わり、従ってアミノ酸も Arg から Gly → ATG-AGG (Arg) → ATG-GGG (Gly) と変化する。

【0062】2) このようにして得た NcoI-AvaI 380bps 断片を、3-2-1で調製した pUCLM の NcoI-AvaI 部位に導入することによりリーダー配列 cDNA をクローニ

ングした。 [pUCLL]

従って、pUCLL における cDNA の 5' 上流および 3' 近辺の配列は pUCLM と全く同じになるはずである。cDNA 5' 端付近の塩基配列はシーケンシングによって確認した。なお、pUCLL を含む大腸菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は F E R M B P - 4 2 6 5 である。

【0063】3-2-2 pUCHM (H鎖成熟 cDNA)

1) 3' 端の調製：pEH16 により、終止コドン TGA の下流 25bps の所にある Avall 部位を利用し、前述の様に Bgl II リンカーを付加し、SmaI-Bgl II で消化して 490bps の断片として 3' 端部分を得て、これを pUC9BglBam の Bgl II-SmaI 部位にクローニングした。 [pUCH6]

【0064】2) H鎖、全長 cDNA の調製：pH113 より、cDNA 5' 端に隣接する pBR322 上の MstI 部位と cDNA の SmaI 部位間の MstI-SmaI 断片 1000bps を切り出し、1) で得た pUCH6 の SmaI 部位に導入した。 [pUCH10]

得られたプラスミド pUCH10 は 5' 端に pBR322 の配列の一部を持ち、3' 端は終止コドンの 25bps 下流に Bgl II 部位を持つ全長の cDNA をクローニングしている。

【0065】3) pUC18 への再クローニング：まず開始コドン ATG を含む pH113 の Hinfl 断片 330bps を pUC18BglSma の Hinc II 部位にクローニングした。 [pUCH12]

次いで、この pUCH12 の Tth1111-Hind III 部位に、2) で得た pUCH10 の Tth1111-Hind III の断片 1230bps を導入した。 [pUCH16]

pUCH16 は cDNA の非翻訳部分を除いたコード領域の全長をもち、開始コドン ATG の上流および終止コドン TGA の下流に Bgl II 部位を持つが、ATG と Bgl II との距離が 30bps あり、またベクターと cDNA の 5' 側接続部分に制限酵素部位を持たない。

【0066】4) 5' 端の調製：cDNA 5' 側のリーダー配列を取り去り、成熟配列の 5' 端に開始コドン ATG を付加するために、L鎖の場合と同様に、合成オリゴマー 19 bs CATG-CAGGTTCAAGCTCCAG (下線の部分が H鎖 cDNA 成熟配列の 5' 端) を用いて、プライマリペア法によって 5' 端 ATG を調製し、Tth1111 で切断することによって、130bps の断片として 5' 先端部分を得た。これを、3) で得た pUCH16 の XbaI (klenow で平滑末端化してある) -Tth1111 部位に導入して、成熟配列をコードする H鎖 cDNA を得た。 [pUCHM]

【0067】3-2-4 pUCHL (H鎖リーダー cDNA)

1) 5' 端の調製：pH113 より、pBR322 上の MstI 部位および cDNA 上の SmaI 部位で切り出した MstI-SmaI 断片 1000bps を pUC18BglSac の SmaI 部位にクローニングし、cDNA の 5' 側を得る。 [pUCH11]

pUCH11 の BglII-Tth1111 部位へ、pH113 cDNA の 5' 端付

近の開始コドン ATG を含む Hinfl 330bps 断片に Bgl II リンカーを付加したものを、Bgl II-Th1111 で消化して得た 190bps 断片を導入して、5' 非翻訳部分を除いた、開始コドンの上流 10bps に Bgl II 部位を持つ、pUCH13 を得た。(ベクターと cDNA 5' 側接続点は Hinfl 部位が再生する。) [pUCH13]

【0068】2) 全長 cDNA の調製：pUCHM の 2) で得た pUCH10 より、3' 側 NcoI-Hind III 1940 bps および 3' 非翻訳部分を除いた、開始コドンの上流および終止コ

10 ドンの下流に Bgl II 部位を持つ、全長 cDNA をクローニングした pUCHL を得た。なお、pUCHL を含む大腸菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は F E R M B P - 4 2 6 6 である。

【0069】3-3 構築ベクターの塩基配列の確認構築した 4 種のベクター pUCLM, pUCLL, pUCHM, pUCHL に於ける pUC18 と cDNA の Bgl II 部位を含む 5' および 3' 側の結合部分の塩基配列をマキサム-ギルバート法によって決定した。いずれの場合も計画した塩基配列の存在を確認した(図 13)。ここに、植物ベクターに組み込む為の条件を満たした cDNA の調製を完了した。

【0070】TMV 抗体遺伝子

プラスミド pUC18 にクローニングされた 4 種 (LL: L鎖、リーダー配列あり、LM: L鎖、リーダー配列なし、HL: H鎖、リーダー配列あり、HM: H鎖、リーダー配列なし) の抗体遺伝子を制限酵素 Bgl II により単離を行った。

【0071】植物発現用ベクターへの TMV 抗体遺伝子の導入

植物発現用ベクターとして pGA643 を用いた。このベクターは、カナマイシン耐性遺伝子、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター、マルチクローニングサイト、T-DNA の左右のボーダーを有するバイナリー発現ベクターである。上述した 4 個 (LL, LM, HL, HM) の遺伝子をそれぞれ pGA643 の Bgl II サイトへ組み込んだあと(図 14)、作製した H鎖遺伝子を有する pGA643 と L鎖遺伝子を有する pGA643 を用いて、L鎖遺伝子と H鎖遺伝子ベクターを同一のベクターに導入する方法をとった。H鎖遺伝子ベクターを制限酵素 EcoRI および Asu II で切断し、35S プロモーターおよび H鎖遺伝子を含む DNA 断片を得たのち、Asu II サイトを大腸菌 DNA ポリメラースクレオニ断片により平滑末端とした後、EcoRI リンカーを接続し L鎖遺伝子ベクターの EcoRI サイトへ組み込んだ(図 15)。以上のように構築して得られた H鎖、L鎖の両遺伝子が連結されたベクターを凍結法によりアグロバクテリウム・ツメファシエンスの菌系種 LBA4404

(ホックマンら、Nature 303:179-180, 1983) に導入した。

【0072】植物材料および形質転換

抗体遺伝子を導入するタバコ品種として、TMV 感病性品種 BY4、および、過敏感型抵抗性を有する F104 を用い

た。温室より採取したタバコの葉をエチルアルコールおよび次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、直径約6mmの葉片ディスクを調製した。この葉片とH鎖、L鎖の両遺伝子が連結されたベクターを導入したアグロバクテウリム・ツメファシエンス LBA4404 約10⁸ 個の細胞とを Linsmaier and Skoog の無機塩類と 30 g/l のショ糖より成る液体培地で48時間共存培養を行った。その後、葉片を滅菌水で洗浄し細菌を洗い落とした後、Linsmaier and Skoog の無機塩類、インドール酢酸 0.3 mg/l、6-(γ -ジメチルアリルアミノ) ブリン 10 mg/l、カナマイシン 200 mg/l、セフォタキシム 250 mg/l および寒天 0.9% を含む茎葉分化培地に置床し、約1ヶ月後、カナマイシン耐性を示す茎葉を Linsmaier and Skoog の無機塩類、30 g/l のショ糖およびセフォタキシム 250 mg/l および寒天 0.9% を含む発根培地に置床した。培養約1ヶ月後、発根した植物体を閉鎖系温室内で栽培した。

【0073】ノーザン分析による TMV抗体遺伝子の mRNA 転写の確認

形質転換体の葉より全 RNA を抽出し、グリオキサールおよび DMSO で変性させた後、アガロースゲル電気泳動により分離した。つぎに、RNA をナイロン膜に移行させ、HM 遺伝子 1.4kb、LM 遺伝子 0.7kb それぞれをランダムプライム法により ³²P で標識したプローブを用いてノーザン分析を行った。LM 遺伝子をプローブとして用いたとき、すべての形質転換体において 1.0kb の mRNA の転写が認められ、これは予測される L鎖遺伝子から転写される mRNA の大きさと一致した。またコントロールとして用いたタバコにはこの様な mRNA の転写は認められなかった。一方、HM 遺伝子をプローブとして用いたとき、全ての形質転換体において 1.7kb の mRNA の転写が認められ、予測される H鎖遺伝子から転写される mRNA の大きさと一致した。また、コントロールとして用いたタバコにはこの様な mRNA の転写は認められなかった。以上の結果からリーダー配列の有無に関係なく全ての形質転換体において、両鎖遺伝子の mRNA が転写されていることが明らかになった。

【0074】ウエスタン分析による H鎖、L鎖タンパク質の会合の確認

ノーザン分析において mRNA の転写が確認された個体についてウエスタン分析を行なった。再分化植物体の葉より全タンパク質を抽出し、4M 尿素、1% SDS、および 2 mM DTT 溶液中で煮沸を行ない変性させた後、SDS-PAGE により分離した。つぎに、セミドライブロッティングによりタンパク質をニトロセルロース膜に移行させ、アルカリフィオスマターゼ標識ヤギ抗マウス IgG を用いて分析を行った。その結果、リーダー配列を有する形質転換体はコントロールのマウスの IgG 同様、H鎖、L鎖のバンドが認められ、両鎖のタンパク質を生成していることが明らかになった。一方、リーダー配列を欠く形質転換

体においてはこの様なバンドは認められず、これらの個体においては両鎖のタンパク質は生成されていないものと考えられた。またコントロールとして用いたタバコにもこの様なタンパク質の生成は認められなかつた。以降の実験ではリーダー配列を含む形質転換体を供試した。

【0075】Protein A による TMV抗体の精製およびウエスタン分析による H鎖、L鎖会合の確認

Protein A は免疫グロブリン G (IgG) の H鎖、Fc 部位に特異的に結合し、各種モノクローナル抗体の精製に利用されている。この特異結合性を利用して Protein A によるタンパク質の精製を行い H鎖、L鎖が植物体内で抗体分子として会合しているかどうかを検討した。まずタンパク質を Protein A により精製し次に、この精製したタンパク質の変性を行い、上述した方法を用いてウエスタン分析を行つた。抗体分子として会合しているならば、ウエスタン分析を行なつた際、両鎖のバンドが検出されるが、会合していない場合は H鎖のみのバンドが検出されるものと考えられる。供試した形質転換体当代の全ての個体で、発現量の差は認められるものの、対照の

マウス IgG と同様な H鎖と L鎖のバンドが検出された。この結果、形質転換体で生成された両鎖が抗体分子として会合していることが明らかとなつた。次に、生成されている抗体の発現量について調査を行つた。デンシシメーターで測定した結果、発現量の高い個体では葉の全可溶性タンパク質の 0.8%、低い個体では 0.2% が本抗体に相当することが確認された。

【0076】ELISA 法による植物体で生成された TMV抗体と抗原である TMVとの結合調査

ELISA 法によって抗体と抗原の結合の調査を行つた。この手法はモノクローナル抗体のスクリーニングに用いられる固相抗体結合分析(SABA) 法を応用したものである。TMVあるいは TMV のコートプロテインをマイクロプレートに吸着させ 3% BSA 含有 PBST を加えブロック処理を行つた後、形質転換体の粗抽出液と反応させた。3% BSA 含有 PBST で洗浄後、アルカリフィオスマターゼ標識マウス IgG と反応させ、基質を加え発色および吸光値の調査を行つた。抗体分子と抗原が結合しているならば抗原、抗体および標識抗体が結合し発色が認められるが、結合していない場合は抗体および標識抗体の結合のみしか起こらず、洗浄により除去されるための発色は認められないことになる。TMV のコートプロテインを単離精製し、TMV 粒子とともに抗原とした。吸着させた抗原と形質転換体自殖 1 代目 BY4 系、F104 系の粗抽出液を反応させ、アルカリフィオスマターゼ標識マウス IgG を加えた。上記の実験はいずれも低温室内で行つた。その結果を自殖 1 代目のウエスタン分析結果とともに表 4、5 に示した。抗原として TMV 粒子とコートプロテインのどちらを用いた場合も、供試した全ての形質転換体において発色が認められ、対照として用いた BY4 および F104 において発色が認められなかつたことから、形質転換

体で生成された抗体が抗原と結合することが明らかとな
った。また、形質転換体の個々の吸光値の差はウエスター
ン分析による発現量の高低とはほぼ対応していた。
*
抗体と抗原との結合試験 (BY4系)

| 形質転換体 | ウエスタン分析 (自殖1代目) | 発色度 | 吸光度 |
|--------|--------------------|-----|------|
| TBL110 | ++ | ++ | 1.5 |
| TBL120 | ++ | ++ | 1.5 |
| TBL140 | ++ | ++ | 1.3 |
| TBL150 | +++ | +++ | 2.5 |
| TBL160 | ++ | ++ | 1.6 |
| TBL170 | +++ | +++ | 2.2 |
| TBL180 | + | + | 0.7 |
| TBL190 | +++ | +++ | 2.1 |
| TBL200 | + | + | 0.6 |
| BY4 | - | - | 0.02 |

+++：高い、++：中程度、+：低い、-：発現、発
色無し

*：測定値はOD₄₀₅ の吸収を示している。
抗体と抗原との結合試験 (F104系)

| 形質転換体 | ウエスタン分析 (自殖1代目) | 発色度 | 吸光度 |
|--------|--------------------|-----|-----|
| TFL110 | + | + | 0.7 |
| TFL120 | ++ | ++ | 1.6 |
| TFL130 | + | + | 0.4 |
| TFL140 | ++ | ++ | 1.6 |
| TFL150 | +++ | +++ | 2.2 |
| TFL160 | +++ | +++ | 2.4 |
| TFL170 | ++ | ++ | 1.8 |
| TFL180 | ++ | ++ | 1.5 |
| TFL190 | +++ | +++ | 2.6 |
| TFL200 | +++ | +++ | 2.3 |
| F104 | - | - | - |

+++：高い、++：中程度、+：低い、-：発現、発
光無し

*：測定値はOD₄₀₅ の吸収を示している。

【0079】

【発明の効果】本発明により、実用価値の高い、ウイルスを抗原とする動物由来のモノクローナル抗体を产生する植物体が初めて提供された。本発明により、分子農業（バイオファーム）を行えば、生産コストのかからない医薬、動物用薬、診断薬用等の抗ウイルス抗体を大量に

得ることができると考えられる。また、本発明により、ウイルス耐病性植物を得ることも可能である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：961

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ACTACTCAAG ACTTTTGTA TCAAGTTCTC AGA ATG AGG TGC CTA GCT GAG TTC 54
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe
 -20 -15
 CTG GGG CTG CTT GTG CTC TGG ATC CTT GGA GCC ATT GGG GAT ATT GTG 102
 Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Leu Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val
 -10 -5 -1 1
 ATG ACT CAG GCT GCA CCC TCT ATA CCT GTC ACT CTT GGA GAG TCA GTA 150
 Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Leu Gly Glu Ser Val
 5 10 15
 TCC ATC TCC TGC AGG TCT AGT AAG AGT CTC CTG CAT AGT AAT GGC AAC 198
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn
 20 25 30 35
 GCT TTC TTG TAT TGG TTC CTA CAG AGG CTA GGC CAG TCT CCT CAG CTC 246
 Ala Phe Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Leu Gly Gln Ser Pro Gln Leu
 40 45 50
 CTG ATA TAT CGG ATA TCC AAC CCT GCC TCA GGT AGT CCA GAC AGG TTC 294
 Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Asn Pro Ala Ser Gly Ser Pro Asp Arg Phe
 55 60 65
 AGT GGC AGT GGG TCA GGA ACT GCT TTC ACA CTG AGA ATC AGT AGA GTG 342
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val
 70 75 80
 GAG GCT GAG GAT GTG GGT GTT TAT TAC TGT ATG CAA CAT CTA GAA TAT 390
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr
 85 90 95
 CCT TTC ACG TTC GAC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT 438
 Pro Phe Thr Phe Asp Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
 100 105 110 115
 GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CAG TTA ACA 486
 Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr
 120 125 130
 TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA 534
 Ser Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys
 135 140 145
 GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC 582
 Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly
 150 155 160
 GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC ACC 630
 Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC 678
 Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 180 185 190 195
 AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC 726
 Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val
 200 205 210
 AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT TAGAGACAAA GGTCTGAGA CGCCACCAC 780
 Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 215
 AGCTCCCCAG CTCCATCCTA TCTTCCCTTC TAAGGTCTTG GAGGCTTCCC CACAAGCGAC 840

25

26

CTACCACTGT TGCAGTCTC CAAACCTCT CCCCACCTCC TTCTCCTCT CCTCCCTTC 900
CTTGCTTT ATCATGCTAA TATTTGAGA AAATATTCAA TAAAGTGAGT CTTTGACTT 960
G 961

配列番号：2

配列の長さ：1 5 5 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

| | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|-------|-----|-----|
| GGACCGCATA | TGATCAGTAA | CCTCTTCACA | GTCACTGAAA | ACACTGACTC | TAATC | ATG | |
| | | | | | | Met | 58 |
| GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT GTC | | | | | | | 106 |
| Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val | | | | | | | |
| -15 | -10 | -5 | | | | | |
| TAC TCA CAG GTT CAG CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA CCT | | | | | | | 154 |
| Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro | | | | | | | |
| -1 | 1 | 5 | 10 | | | | |
| GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT | | | | | | | 202 |
| Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr | | | | | | | |
| 15 | 20 | 25 | 30 | | | | |
| AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA | | | | | | | 250 |
| Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu | | | | | | | |
| 35 | 40 | 45 | | | | | |
| TGG ATT GGG GCT ATT TAT CCT GGA AAT GGT GAT ACT AGG TAC ACT CAG | | | | | | | 298 |
| Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln | | | | | | | |
| 50 | 55 | 60 | | | | | |
| AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC AGC ACA | | | | | | | 346 |
| Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr | | | | | | | |
| 65 | 70 | 75 | | | | | |
| GCC TAC ATG CAA CTC AGC GCC TTG GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT | | | | | | | 394 |
| Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ala Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr | | | | | | | |
| 80 | 85 | 90 | | | | | |
| TAC TGT GCA AGA GAG GGG GGT TAC TCC TGG TCC GAC TAT GCT ATG GAC | | | | | | | 442 |
| Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Ser Trp Ser Asp Tyr Ala Met Asp | | | | | | | |
| 95 | 100 | 105 | 110 | | | | |
| TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACG ACA | | | | | | | 490 |
| Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr | | | | | | | |
| 115 | 120 | 125 | | | | | |
| CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT GCC CAA ACT AAC | | | | | | | 538 |
| Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn | | | | | | | |
| 130 | 135 | 140 | | | | | |
| TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT TTC CCT GAG CCA | | | | | | | 586 |
| Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro | | | | | | | |
| 145 | 150 | 155 | | | | | |
| GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCC CTG TCC AGC GGT GTG CAC ACC | | | | | | | 634 |
| Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr | | | | | | | |
| 160 | 165 | 170 | | | | | |
| TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG AGC AGC TCA GTG | | | | | | | 682 |
| Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val | | | | | | | |
| 175 | 180 | 185 | 190 | | | | |
| ACT GTC CCC TCC AGC CCT CGG CCC AGC GAG ACC GTC ACC TGC AAC GTT | | | | | | | 730 |
| Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val | | | | | | | |

27

28

| | | | |
|--|------|-----|------|
| 195 | 200 | 205 | 778 |
| GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG AAA ATT GTG CCC AGG | | | |
| Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA GTC CCA GAA GTA TCA TCT | | | 826 |
| Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser | | | |
| 225 | 230 | 235 | |
| GTC TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAG GAT GTG CTC ACC ATT ACT CTG | | | 874 |
| Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu | | | |
| 240 | 245 | 250 | |
| ACT CCT AAG GTC ACG TGT GTT GTG GTA GAC ATC AGC AAG GAT GAT CCC | | | 922 |
| Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro | | | |
| 255 | 260 | 265 | 270 |
| GAG GTC CAG TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAT GTG GAG GTG CAC ACA GCT | | | 970 |
| Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| CAG ACG CAA CCC CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC | | | 1018 |
| Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| AGT GAA CTT CCC ATC ATG CAC CAG GAC TGG CTC AAT GCC AAG GAG TTC | | | 1066 |
| Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe | | | |
| 305 | 310 | 315 | |
| AAA TGC AGG GTC AAC AGT GCA GCT TTC CCT GCC CCC ATC GAG AAA ACC | | | 1114 |
| Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr | | | |
| 320 | 325 | 330 | |
| ATC TCC AAA ACC AAA GGC AGA CCG AAG GCT CCA CAG GTG TAC ACC ATT | | | 1162 |
| Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile | | | |
| 335 | 340 | 345 | 350 |
| CCA CCT CCC AAG GAG CAG ATG GCC AAG GAT AAA GTC AGT CTG ACC TGC | | | 1210 |
| Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| ATG ATA ACA GAC TTC CCT GAA GAC ATT ACT GTG GAG TGG CAG TGG | | | 1258 |
| Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| AAT GGG CAG CCA GCG GAG AAC TAC AAG AAC ACT CAG CCC ATC ATG AAC | | | 1306 |
| Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn | | | |
| 385 | 390 | 395 | |
| ACG AAT GGC TCT TAC TTC GTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG CAG AAG AGC | | | 1354 |
| Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser | | | |
| 400 | 405 | 410 | |
| AAC TGG GAG GCA GGA AAT ACT TTC ACC TGC TCT GTG TTA CAT GAG GGC | | | 1402 |
| Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly | | | |
| 415 | 420 | 425 | 430 |
| CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGC CTC TCC CAC TCT CCT GGT <u>AAA</u> | | | 1450 |
| Leu His Asn His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| TGATCCAGT GTCCTGGAG CCCTCTGGTC CTACAGGACT CTGACACCTA CCTCCACCCC | 1510 | | |
| TCCCTGTATA AATAAAGCAC CCAGCACTGC CTTGGGACCC TGC | 1553 | | |

【図面の簡単な説明】

である。

【図1】P-7モノクローナル抗体の精製方法を示す図 50 【図2】P-7モノクローナル抗体のI鎖とH鎖の分離

方法を示す図である。

【図3】実施例で作製されたL鎖cDNAクローニング及びH鎖cDNAクローニングの制限酵素地図である。

【図4】実施例で作製されたH鎖cDNAクローニングの制限酵素地図及び文献に示されたH鎖cDNAの制限酵素地図である。

【図5】実施例で作製されたH鎖cDNAクローニングの制限酵素地図である。

【図6】実施例で得られたL鎖cDNAの塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す図である。

【図7】図6に示す配列の続きを示す図である。

【図8】実施例で得られたH鎖cDNAの塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す図である。

【図9】図8に示す配列の続きを示す図である。

【図10】図9に示す配列の続きを示す図である。

【図11】実施例で用いた各ベクターのマルチクローニング部分の制限酵素部位を示す図である。

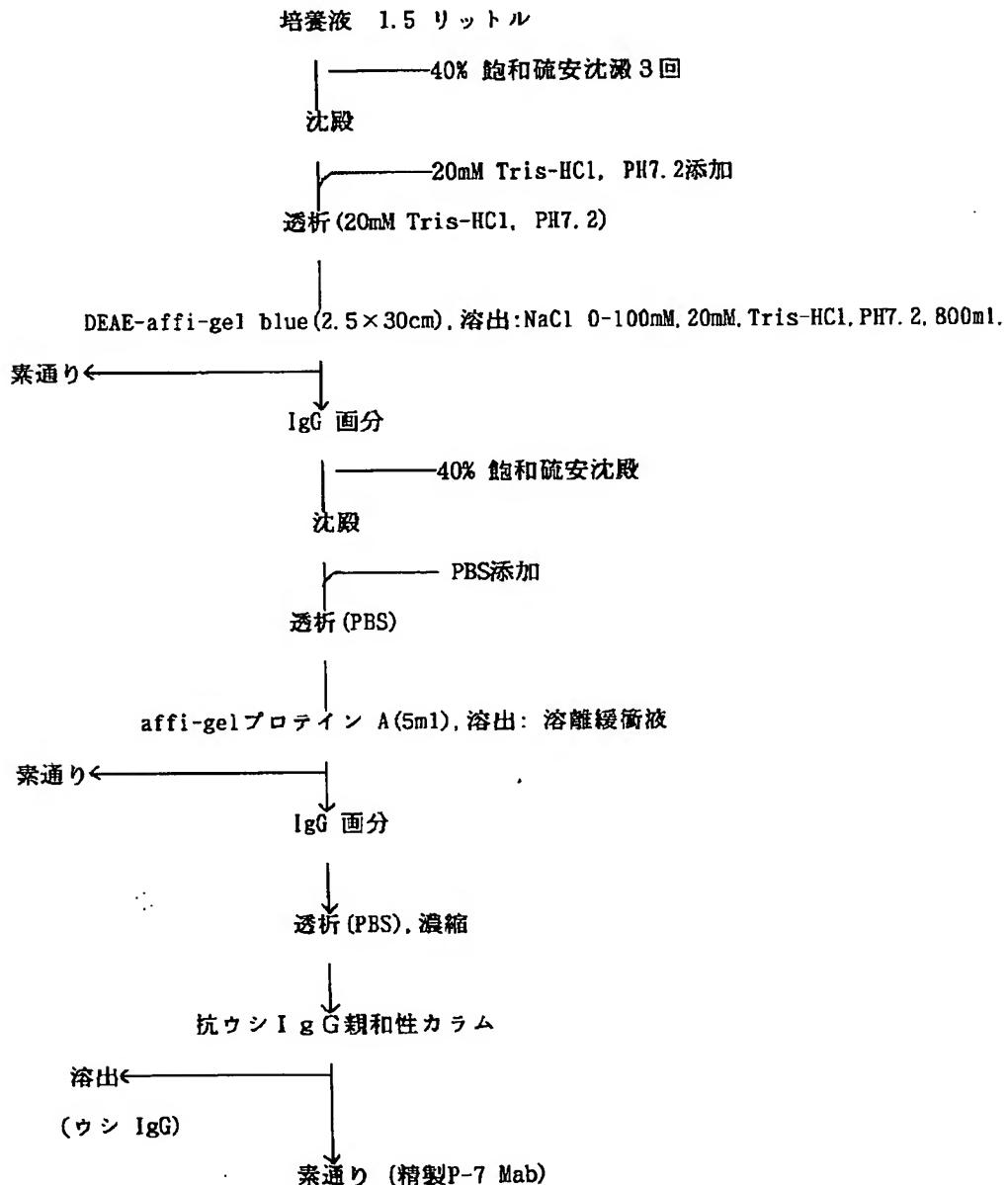
【図12】実施例で作製した、L鎖リーダー配列含有cDNAの作製方法を示す図である。

【図13】実施例で作製した各組換えベクターの部分的塩基配列を示す図である。

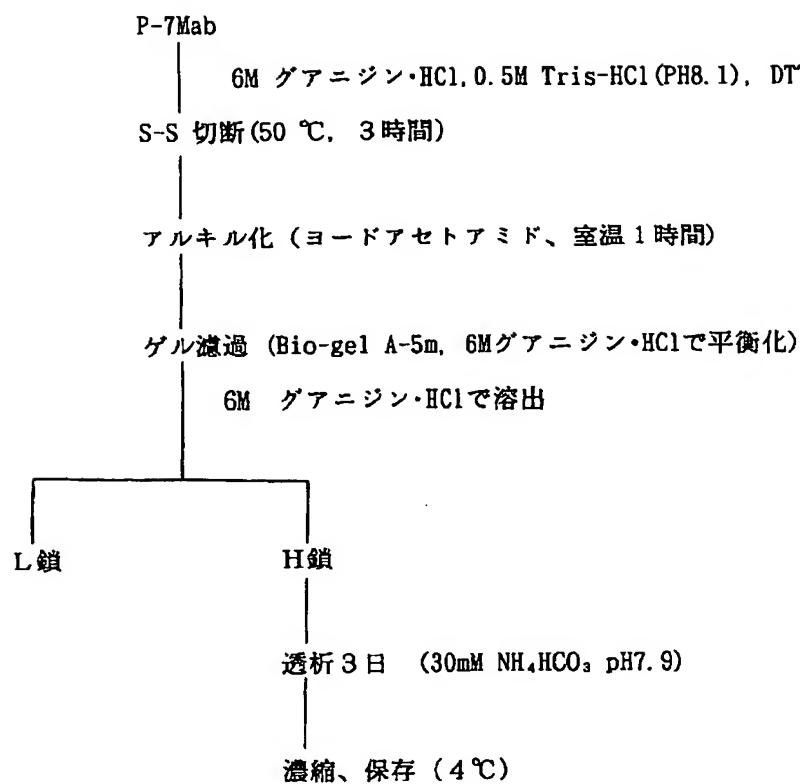
【図14】L鎖cDNA又はH鎖cDNAをT_iプラスミドベクターであるpGA643に組み入れた組換えベクターの遺伝子地図である。

【図15】L鎖遺伝子及びH鎖遺伝子を連結したベクターの構築方法を示す図である。

【図1】



【図2】



【図12】

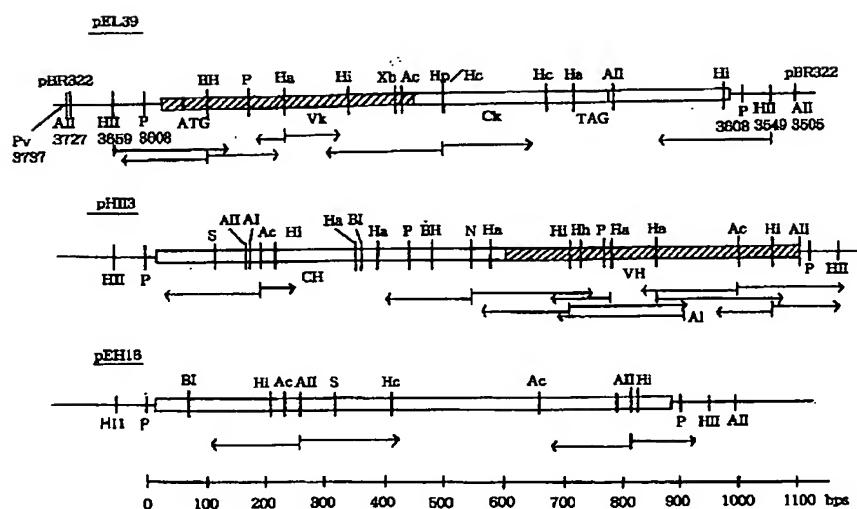
リーダー配列
5'--CTCAGA-ATG-AGGTGCC--3'
BanI

↓ BanI消化、クレノウ断片で平滑末端化
5' GTGCC--3'
CACGG--

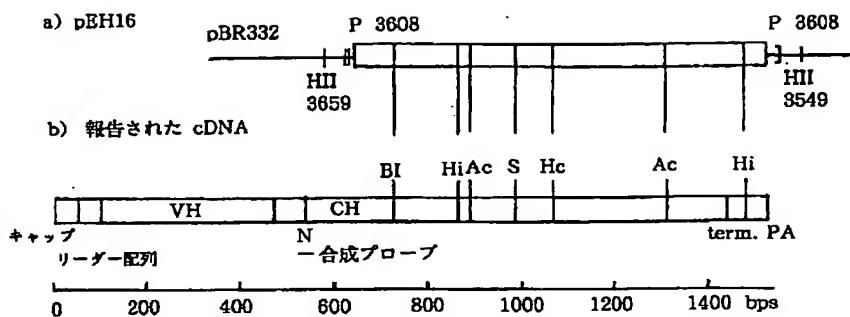
↓ NcoIリシンカーキングライゲーション
5' CCCATGGG-GTGCC--3'
GGGTACCC-CACGG--

↓ Neol, Aval 消化
5' CATG-GGGTGCC-----
CCCACGG----- Aval 部位

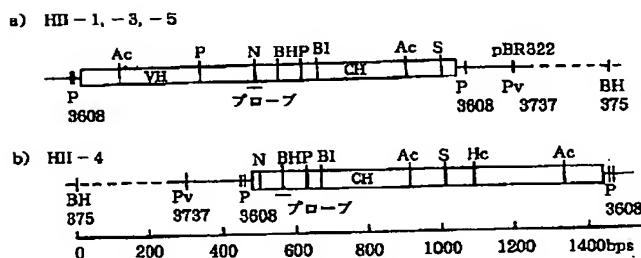
【図3】



【図4】



【図5】



【図11】

pUC18 :::: 5' GAATTCTGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG 3'
 EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC18BgSac::: GAATTCCAGATCTGCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG
 EcoRI BglIII KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC18BgSma::: GAATTCTGAGCTCGGTACCCAGATCTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG
 EcoRI SacI KpnI BglIII BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC9 ::::::: AAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTC
 Hind PstI SalI BamHI SmaI EcoRI

pUC9BgBam :: AAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCAGATCTGATCCCCGGGAATTC
 Hind PstI SalI BglIII SmaI EcoRI

【図6】

10 20 30 40 50 60
 ACTACTCAAGACTTTTGATCAAGTCTCAGAATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCTGGGG
 MetArgCysLeuAlaGluPheLeuGly

70 80 90 100 110 120
 CTGCTTGTGCTCTGGATCCTGGAGCCATTGGGGATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCC
 LeuLeuValLeuTrpIleLeuGlyAlaIleGlyAspIleValMetThrGlnAlaAlaPro
 リーダー配列←→成熟

130 140 150 160 170 180
 TCTATACCTGTCACTCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTC
 SerIleProValThrLeuGlyGluSerValSerIleSerCysArgSerSerLysSerLeu

190 200 210 220 230 240
 CTGCATAGTAATGGCAACGCTTCTTGATTTGGTCTCACAGAGGCTAGGCCAGTCTCCT
 LeuHisSerAsnGlyAsnAlaPheLeuTyrTrpPheLeuGlnArgLeuGlyGlnSerPro

250 260 270 280 290 300
 CAGCTCCTGATATCGGATATCCAACCCTGCCTCAGGTAGTCCAGACAGGTTAGTGGC
 GlnLeuLeuIleTyrArgIleSerAsnProAlaSerGlySerProAspArgPheSerGly

310 320 330 340 350 360
 AGTGGGTCAAGGAAC TGCTTCACACTGAGAACATCAGTAGACTGGAGGCTGAGGATGTGGGT
 SerGlySerGlyThrAlaPheThrLeuArgIleSerArgValGluAlaGluAspValGly

370 380 390 400 410 420
 GTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAAATATCCTTCACTGACTCGGGGACAAAGTTG
 ValTyrTyrCysMetGlnHisLeuGluTyrProPheThrPheAspSerGlyThrLysLeu

430 440 450 460 470 480
 GAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTCCCACCATCCAGTGAGCAG
 GluIleLysArgAlaAspAlaAlaProThrValSerIlePheProProSerSerGluGln
 →CK

490 500 510 520 530 540
 TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCCAAAGACATC
 LeuThrSerGlyGlyAlaSerValValCysPheLeuAsnAsnPheTyrProLysAspIle

【図7】

550 560 570 580 590 600
 AATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
 AsnValLysTrpLysIleAspGlySerGluArgGlnAsnGlyValLeuAsnSerTrpThr

610 620 630 640 650 660
 GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGAC
 AspGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerMetSerSerThrLeuThrLeuThrLysAsp

670 680 690 700 710 720
 GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAGACATCAACTTCACCC
 GluTyrGluArgHisAsnSerTyrThrCysGluAlaThrHisLysThrSerThrSerPro

730 740 750 760 770 780
 ATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGAGACAAAGGTCTGAGACGCCACCACC
 IleValLysSerPheAsnArgAsnGluCys***

790 800 810 820 830 840
 AGCTCCCCAGCTCCATCCTATCTTCCCTTAAGGTCTTGGAGGCTTCCCCACAAGCGAC

850 860 870 880 890 900
 CTACCACTGTTGGGTGCTCCAAACCTCCTCCCCACCTCCTCTCCTCCTCCCTTC

910 920 930 940 950 960
 CTTGGCTTTATCATGCTAATATTTGCAGAAAATATTCAATAAGTGAGTCTTGCACCT
 G

【図8】

10 20 30 40 50 60
 GGACCGCATATGATCAGTAACCTCTCACAGTCACTGAAAAACACTGACTCTAATCATGGA
 MetGlu

70 80 90 100 110 120
 ATGTAACTGGATACTTCCTTTATTCTGTCAGTAACCTCAGGTGTCTACTCACAGGTTCA
 CysAsnTrpIleLeuProPheIleLeuSerValThrSerGlyValTyrSerGlnValGln
 リーダー配列←→成熟

130 140 150 160 170 180
 GCTCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAA
 LeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysLeuSerCysLys

190 200 210 220 230 240
 GGCTCTGGCTACACCTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACA
 AlaSerGlyTyrThrPheThrSerTyrTrpMetGlnTrpValLysGlnArgProGlyGln

250 260 270 280 290 300
 GGGCTGGAATGGATTGGGGCTATTTATCCTGGAAATGGTACTAGGTACACTCAGAA
 GlyLeuGluTrpIleGlyAlaIleTyrProGlyAsnGlyAspThrArgTyrThrGlnLys

310 320 330 340 350 360
 GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACT
 PheLysGlyLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeu

370 380 390 400 410 420
 CAGCGCCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGTTACTC
 SerAlaLeuAlaSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgGluGlyGlyTyrSer

430 440 450 460 470 480
 CTGGTCCGACTATGCTATGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGC
 TrpSerAspTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerAla
 VH, D ←→ JH4 ←→

【図9】

490 500 510 520 530 540
 CAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTC
 LysThrThrProProSerValTyrProLeuAlaProGlySerAlaAlaGlnThrAsnSer
 → CH

550 560 570 580 590 600
 CATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTCCTGAGCCAGTGACAGTOACCTG
 MetValThrLeuGlyCysLeuValLysGlyTyrPheProGluProValThrValThrTrp

610 620 630 640 650 660
 GAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCT
 AsnSerGlySerLeuSerSerGlyValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerAspLeu

670 680 690 700 710 720
 CTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCAC
 TyrThrLeuSerSerValThrValProSerSerProArgProSerGluThrValThr

730 740 750 760 770 780
 CTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGA
 CysAsnValAlaHisProAlaSerSerThrLysValAspLysLysIleValProArgAsp

790 800 810 820 830 840
 TTGTGGTTGTAAGCCTTGATATGTACAGTCCCAGAACTATCATCTGTCTTCATCTTCCC
 CysGlyCysLysProCysIleCysThrValProGluValSerSerValPheIlePhePro

850 860 870 880 890 900
 CCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAACGGTACGTGTGTTGTGGT
 ProLysProLysAspValLeuThrIleThrLeuThrProLysValThrCysValValVal

910 920 930 940 950 960
 AGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAAGGTACGTGTGTTGTGGAGGT
 AspIleSerLysAspAspProGluValGlnPheSerTrpPheValAspAspValGluVal

970 980 990 1000 1010 1020
 GCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTAACAGCACTTCCGCTCAGTCAG
 HisThrAlaGlnThrGlnProArgGluGluGlnPheAsnSerThrPheArgSerValSer

【図10】

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAA
 GluLeuProIleMetHisGlnAspTrpLeuAsnGlyLysGluPheLysCysArgValAsn

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CAGTGCAGCTTCCTGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCAAAGGCAGACCGAA
 SerAlaAlaPheProAlaProIleGluLysThrIleSerLysThrLysGlyArgProLys

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGCCAAGGATAAGTCAG
 AlaProGlnValTyrThrIleProProProLysGluGlnMetAlaLysAspLysValSer

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAA
 LeuThrCysMetIleThrAspPhePheProGluAspIleThrValGluTrpGlnTrpAsn

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGAAACACGAATGGCTCTTA
 GlyGlnProAlaGluAsnTyrLysAsnThrGlnProIleMetAsnThrAsnGlySerTyr

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCAC
 PheValTyrSerLysLeuAsnValGlnLysSerAsnTrpGluAlaGlyAsnThrPheThr

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTC
 CysSerValLeuHisGluGlyLeuHisAsnHisHisThrGluLysSerLeuSerHisSer

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCCTGGTAAATGATCCCAGTGTCCCTGGAGCCCTCTGGCCTACAGGACTCTGACACCTA
 ProGlyLys***

1510 1520 1530 1540 1550
 CCTCCACCCCTCCCTGTATAAATAAGCACCCAGCACTGCCTGGACCCCTGC

【図13】

MCS配列

(-lacZ' プロモータ---MCS---lacZ')

(1) pUCLM L鎖成熟配列

-GAATTCCAGATCTGCGGTACCCCATGGATATTGTGA-----TAGAGACAAAGGTCC

EcoRI BgIII KpnI NcoI cDNA 680 bps Avall

AGATCTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC-

BgIII BamHI XbaI AccI PstI SphI HindIII

(2) pUCLL L鎖リーダー配列

-CAATTCCAGATCTGCGGTACCCCATGGGGTAGCCTAG-----TAGAGACAAAGGTCC

EcoRI BgIII KpnI NcoI BamI cDNA 740 bps Avall

AGATCTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC-

BgIII BamHI XbaI AccI PstI SphI HindIII

(3) pUCHM H鎖成熟配列

-GAATTCGAGCTCGGTACCCCCAGATCTGGGGATCCTCTAGCATGCAGGTTCAGC-----

EcoRI SacI KpnI BgIII BamHI SphI cDNA 1400 bps

TGATCCCAGTGTCCCTGGAGCCCTCTGGTCCCAGATCTGCAGATCTGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGC-

Avall BgIII BgIII AccI PstI HindIII

PstI

(4) pUCHL H鎖リーダー配列

-GAATTCCAGATCTGACTCTAACATGGAATGTAACT-----TGATCCCAGTGTCCCTGGAGCCCTCTGGTCC

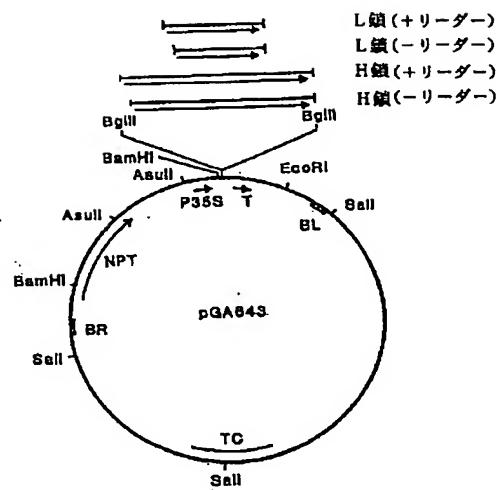
EcoRI BgIII Hinfi cDNA 1440 bps Avall

AGATCTGCAGATCTGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGC-

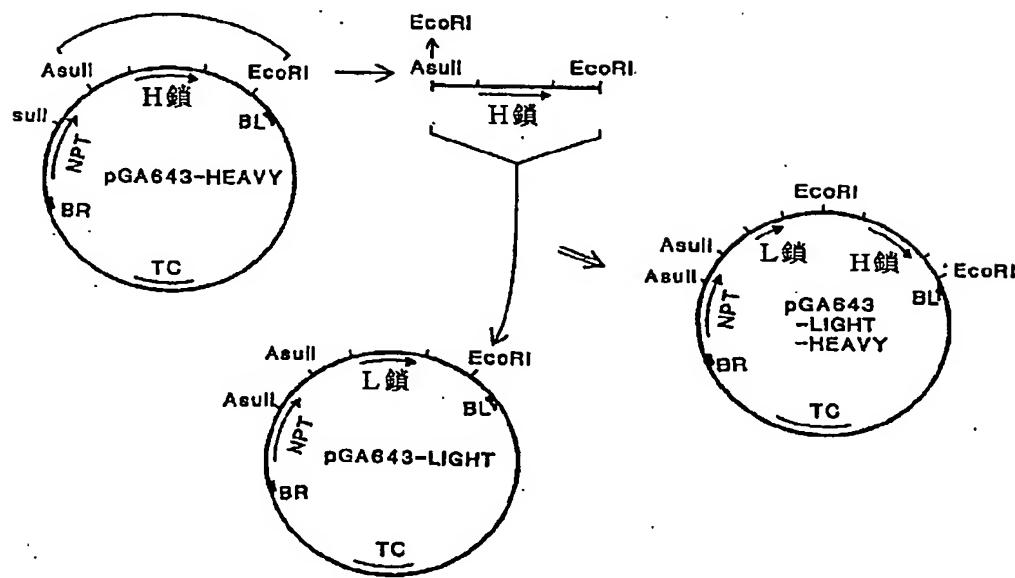
BgIII BgIII AccI PstI HindIII

PstI

【図14】



【図15】



【手続補正書】

【提出日】平成5年6月21日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】抗ウイルス抗体を産生する植物及び
その作出方法

フロントページの続き

(72)発明者 神代 隆
静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ
産業株式会社遺伝育種研究所内

(72)発明者 村藤 仁昭
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内

(72)発明者 高見 正明
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内

(72)発明者 文野 正恭
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内